

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. August 2005 (11.08.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/072711 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 31/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/000923

(22) Internationales Anmeldedatum:  
31. Januar 2005 (31.01.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 004 901.7 30. Januar 2004 (30.01.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ** [DE/DE]; Saarstrasse 21, 55122 Mainz (DE). **JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT WÜRZBURG** [DE/DE]; Sanderring 2, 97070 Würzburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BRINGMANN, Gerhard** [DE/DE]; Gertrud-von-le-Fort-Strasse 41, 97074 Würzburg (DE). **LANG, Gerhard** [DE/DE]; Schillerstrasse 3, 97072 Würzburg (DE). **GULDER, Tobias** [DE/DE]; Institut Für Organische Chemie, Am Hubland, 97074 Würzburg (DE). **SCHAUMANN, Karsten** [DE/DE]; Im Grabensmoor 5, 27578 Bremerhaven (DE). **MUELLER, Werner, E., G.** [DE/DE]; Semmelweisstrasse 12, 65203 Wiesbaden (DE). **PEROVIC-OTTSTADT, Sanja** [RU/DE]; Im Niederfeld 13, 65462 Ginsheim-Gustavsburg (DE). **STOEHR, Ruediger** [DE/DE]; Institut Für Meereskunde, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel (DE). **WIESE, Jutta** [DE/DE]; Institut Für Meereskunde, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel (DE). **SCHMALJOHANN, Rolf**; Institut Für Meereskunde,

Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel (DE). **IMHOFF, Johann**; Institut Für Meereskunde, Düsternbrooker Weg 20, 24105 Kiel (DE).

(74) Anwälte: **KRAUSS, Jan, B.** usw.; Boehmert & Boehmert, Pettenkoferstrasse 20-22, 80336 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

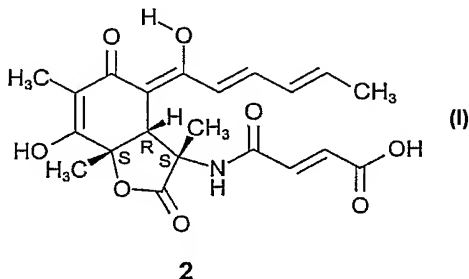
**Veröffentlicht:**

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit Angaben über hinterlegtes biologisches Material, eingereicht gemäss Regel 13bis, getrennt von der Beschreibung

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SORBICILLACTONE A

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON SORBICILLACTON A



(57) Abstract: The invention relates to an improved method for cultivating the fungus *Penicillium chrysogenum*, especially strain KIP 3201, for producing the antitumoral natural substance Sorbicillactone A of formula (I) and its derivatives in an optimized manner and in large amounts. The invention also relates to an optimized method for obtaining and purifying said substance from the fungal biomass and from the culture medium. The invention also describes the biological activity of Sorbicillactone A of formula (I) and investigations relating to the genotoxicity of the compound.

(57) Zusammenfassung: Es werden Verfahren zur verbesserten Kultivierung des Pilzes *Penicillium chrysogenum*, insbesondere Stamm KIP 3201, zur opti-

mierten Produktion des antitumoralen Naturstoffes Sorbicillacton A (2) und Derivaten davon in grossen Mengen Formel (I) sowie optimierte Verfahren zu dessen Gewinnung und Aufreinigung aus der Pilzbiomasse und aus dem Kulturmedium beschrieben. Weiterhin werden die biologische Aktivität von Sorbicillacton A (2) und Untersuchungen zur Genotoxizität der Verbindung beschrieben.

## **Verfahren zur Herstellung von Sorbicillacton A**

### **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur optimierten Herstellung der biologisch aktiven Verbindung Sorbicillacton A und Derivaten davon durch Anzucht von *Penicillium chrysogenum*, insbesondere Stamm KIP 3201. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Aufreinigung großer Mengen an Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium und der Pilzbiomasse sowie die Verwendung von Sorbicillacton A zur Behandlung von Erkrankungen und Infektionen.

### **Hintergrund der Erfindung**

Die Suche nach neuen biologisch aktiven Verbindungen erfolgt vor allem auf zwei Wegen. Die Isolierung aktiver Naturstoffe aus biologischen Systemen auf der einen Seite, sowie die Synthese neuartiger Verbindungen, zum Teil inspiriert von Sekundärmetaboliten aus der Natur, auf der anderen. Besonders interessant ist dabei die Untersuchung der Metaboliten von Makro- und Mikroorganismen in schwer zugänglichen und extremen Lebensräumen. So stellen beispielsweise marine eukaryontische Organismen, speziell Schwämme, eine reiche Quelle bioaktiver Substanzen dar. (Sarma AS, Daum T, Müller WEG (1993) Secondary metabolites from marine sponges. Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Ullstein-Mosby Verlag, Berlin). Grund hierfür ist die sessile Lebensweise dieser Organismen. Sie sind auf den Herantransport ihrer Nahrung, schwebende Partikel (Algen, Bakterien oder Pilze) im Wasser, angewiesen. Diese Partikel werden über einen ständigen Wasserstrom eingestrudelt. Dies führt zu einer erhöhten Gefahr der Erkrankung an Bakterien- oder Pilzinfektionen. Schwämme sind aus diesem Grund auf effiziente Abwehrmechanismen zum Schutz vor derartigen Infektionen durch biologisch aktive Sekundärmetabolite angewiesen. Es bleibt allerdings häufig unklar, ob diese Substanzen vom Schwamm selbst, oder von einem der zahlreichen mit dem Schwamm assoziierten Mikroorganismen gebildet werden. Es ist daher besonders interessant,

diese im Schwamm lebenden Mikroorganismen zu isolieren und deren Metabolitenspektrum zu untersuchen. Folglich ist es ein Hauptziel der Forschung, Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen, diese Mikroorganismen in Kultur zu züchten, um deren biologisch aktiven Sekundärmetabolite in ausreichenden Mengen verfügbar zu machen.

Heute kann angenommen werden, daß lediglich etwa 5 % der in marinen eukaryontischen Organismen vorkommenden Mikroorganismen kultivierbar sind. Folglich kann davon ausgegangen werden, daß deren Potential noch weitgehend ungenutzt ist. Zur erfolgreichen und nachhaltigen Nutzung dieser Mikroorganismen als Quellen neuer Pharmazeutika ist es wichtig, Kultivierungsmethoden zu entwickeln, die sich dadurch auszeichnen, daß die Produktion der gewünschten Metaboliten möglichst stark gesteigert wird, während die Bildung der unerwünschten Nebenprodukte weitgehend unterbunden wird.

Das Anwendungsspektrum für eine kommerzielle Nutzung der bioaktiven Sekundärmetabolite ist breit und reicht von der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, bakterieller, viraler und fungaler Infektionen bis hin zur Therapie von Tumoren.

Intensiv wird dabei auch nach solchen bioaktiven Substanzen gesucht, die eine hohe Spezifität gegen definierte Tumoren entfalten und gleichzeitig opportunistische Infektionen, z. B. durch Viren, eindämmen.

Die bioaktive Substanz Sorbicillacton A und Derivate davon wurden kürzlich aus einem *Penicillium*-Stamm isoliert, der aus einem marinen Schwamm der Gattung *Ircinia* isoliert wurde (DE 102 38 257.3). Es wurde dabei gefunden, daß Sorbicillacton A und Derivate davon nicht vorhersehbare ausgeprägte antitumorale und antivirale als auch entzündungshemmende Eigenschaften aufweisen. Eine Hochskalierung der bisher verwendeten Verfahren zur Herstellung dieser Substanz und ihrer Derivate war bisher nicht möglich. Allerdings ist die zuverlässige Herstellung von großen Mengen an Sorbicillacton A und Derivaten davon für die vielversprechende Verwendung in der

Behandlung von Erkrankungen, wie beispielsweise von Krebs und Entzündungen, dringend notwendig.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur optimierten Produktion des Naturstoffes Sorbicillacton A und Derivaten davon, sowie zur Extraktion von Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium und der Pilzbiomasse und zur Aufreinigung großer Mengen an Sorbicillacton A und Derivaten davon zur Verfügung zu stellen.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe zunächst durch das Bereitstellen eines Verfahrens gelöst, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Anzüchten eines Pilzes der Gattung *Penicillium* bei 20-25 °C in einem geeigneten Anzuchtmedium bei einer Salzkonzentration von 2-5 % bis zum Ausbilden eines kompakten Oberflächenmycels,
- b) Erhöhen der Temperatur auf 28-35°C und weiteres Inkubieren für 5-10 Tage,
- c) Abtrennen der Kulturflüssigkeit vom Mycel, und
- d) Extrahieren von Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium, und gegebenenfalls,
- e) Unterschichten des Mycels mit frischem Medium mit einer verringerten Salzkonzentration von 0,5-1,5 % und Inkubieren bei 28-35°C für 3-8 Tage,
- f) Wiederholen von Schritt c) und d), und gegebenenfalls,
- g) Wiederholen der Schritte e) bis f); und
- h) Extrahieren von Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium und/oder den Mycelien.

Erfindungsgemäß handelt es sich somit um ein Verfahren, bei dem das Anzüchten des Pilzes unter besonderen Bedingungen erfolgt, die eine erhöhte Ausbeute und gleichzeitig erhöhte Produktionsraten bewirken. So werden Wachstum und Produktion von Sorbicillacton A sowie Vorstufen bzw. Derivaten davon durch die Variation der Kulturbedingungen gesteuert und z. B. durch Zugabe von NaCl initiiert und stimuliert. Insbesondere wird die Produktion dadurch beschleunigt, daß in Stufenprozessen Bedingungen für optimales Wachstum und optimale Produktionsbedingungen nacheinander realisiert werden, z. B. durch einen Wechsel der Inkubationstemperatur von beispielsweise 20-25°C auf 28-35°C und einen Wechsel der Salzkonzentration von 2-5 % auf 0.5-1.5 %. Bei anderen Inkubationstemperaturen wurde gar keine oder nur geringe Produktion von Sorbicillacton A und/oder Derivaten davon gefunden. Überraschenderweise stellt das Verfahren der vorliegenden Erfindung somit zuverlässig große Mengen an Sorbicillacton A und Derivaten davon zur Verfügung.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Verfahren, wobei der Pilz *Penicillium chrysogenum*, insbesondere der Stamm KIP 3201, zur Produktion verwendet wird.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Erhöhung der Ausbeute an Sorbicillacton A dadurch erreicht wird, daß die Anzuchtmedien durch Variation der Substrate und Substratkonzentrationen, wie z. B. durch Zugabe von Pyruvat, Glutamat, Prolin und Acetat, aber auch von Sorbicillin und anderen biosynthetischen Vorstufen von Sorbicillacton A, verändert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein Verfahren, in dem die Produktion von Sorbicillacton A und Derivaten davon im Flachbettverfahren erfolgt. Eine Produktion von Sorbicillacton A und Derivaten davon kann weiterhin dadurch beschleunigt werden, daß zu geeigneten Zeitpunkten die flüssige Phase von den Zellen

getrennt wird und die Zellen mit frischem Medium versorgt erneut zur Produktion angeregt werden. Geeignete Zeiten sind beispielsweise 3-10 Tage.

Bevorzugt wird eine Art des Inokulums in Form einer Festkörper-gebundenen Form des Pilzes, dessen Animpfmaterial auf schwimmfähigen Festkörpern, z. B. Getreidekörnern oder Styroporkugeln, dargeboten wird.

Weiterhin bevorzugt wird ein Verfahren, wobei ein Absinken des Oberflächenpilzmycels verhindert wird. Das kann dadurch erfolgen, daß eine Trägervorrichtung zur Stabilisierung des Oberflächenmycels in die Anzuchtbehälter integriert wird. Eine geeignete Form einer Trägervorrichtung stellt dabei beispielsweise ein Netz dar.

Ein bevorzugtes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das produzierte Sorbicillacton A und Derivate davon, unmittelbar aus den Kulturmedien an einen festen Austauscher gebunden werden. Aus dieser gebundenen Form erfolgt dann eine Aufreinigung in weiteren Schritten. Dabei kann die Elution vom Austauscher mit organischen Lösungsmitteln, wie Methanol, Ethanol, Ethylacetat, Heptan oder Acetonitril, erfolgen. Auf diese Weise kann Sorbicillacton A und Derivate davon in hochangereicherter Form vom Austauscher gewonnen werden.

Ein weiteres bevorzugtes Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß das produzierte Sorbicillacton A und Derivate davon aus dem Pilzmycel, das vom Kulturmedium abgetrennt wurde, durch Versetzen mit organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Dabei wird bevorzugt Ethylacetat verwendet.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung handelt es sich um ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß eine weitere Extraktion der Rohextrakte durchgeführt wird. Dabei können die Rohextrakte angesäuert und anschließend Sorbicillacton A und Derivate davon mittels organischen Lösungsmitteln extrahiert werden. Dabei wird ebenfalls bevorzugt Ethylacetat verwendet.

Weiterhin ist es vorteilhaft, eine optimierte Aufreinigung der Extrakte mittels Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC) durchzuführen. Weiterhin wird eine optimierte Aufreinigung der Extrakte mittels Gelchromatographie, z. B. an Sephadex LH-20, bevorzugt. Dabei können verschiedene organische Lösungsmittel zur Elution von Sorbicillacton A und Derivaten davon verwendet werden.

Ein bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine Derivatisierung von Sorbicillacton A zum Sorbicillacton-A-methylester umfaßt.

Es wurde gefunden, daß neuronale Zellen, die mit Sorbicillacton A inkubiert wurden, nach Zugabe von L-Glutaminsäure und Serotonin (5-HT) einen starken Abfall des intrazellulären Kalziumspiegels zeigten. L-Glutaminsäure und Serotonin sind als Neurotransmitter in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen etiologisch involviert. Aufgrund dieser Eigenschaften könnten Sorbicillacton A oder Derivate davon in der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen und der damit verbundenen Symptom-Komplexe verwendet werden.

Weiterhin wurde die Genotoxizität von Sorbicillacton A an L5178Y-Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) getestet. Es wurde gefunden, daß in Zellen, die mit 1, 3 und 10 µg/mL Sorbicillacton A inkubiert wurden, keine DNS-Strangbrüche induziert wurden. Dagegen wurde ein signifikanter Anstieg des Anteils der DNS-Strangbrüche nach 24 Stunden Inkubation bei einer Konzentration von 30 µg/mL Sorbicillacton A gefunden. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es vorteilhaft, Sorbicillacton A oder Derivate davon in der Behandlung von Leukämie zu verwenden.

Auch induziert Sorbicillacton A in L5178Y-Zellen nach 4 Stunden Inkubation bei einer Konzentration von 10 und 30 µg/mL Apoptose. Aufgrund dieser Eigenschaften wird die Verwendung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon in der Behandlung von Leukämie bevorzugt.

Weiterhin können Sorbicillacton A oder Derivate davon bei der Behandlung viraler, Infektionen angewendet werden. Einzelheiten dazu sind in den Beispielen der DE 102 38 257.3 beschrieben.

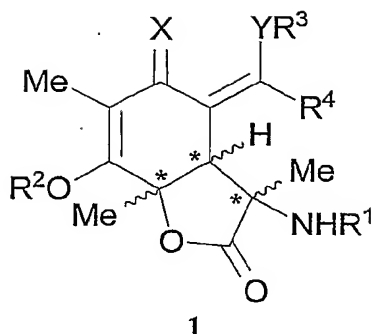
Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, wobei Sorbicillacton A oder Derivate davon zusammen mit geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Hilfs- und Zusatzstoffe formuliert werden. Bevorzugt werden dabei pharmazeutische Zusammensetzungen, in denen Sorbicillacton A oder Derivate davon in einer Menge vorliegen, daß ein Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 30 µg/ml bei der Behandlung in vivo vorliegt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft den Pilzstamm der Gattung *Penicillium chrysogenum* KIP 3201. Dieser wurde am 14. Januar 2004 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM 16137 hinterlegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindungen soll unter einem "Derivat" eine von der allgemeinen Formel 1 abgeleitete Verbindung sein, die zum Beispiel durch verschiedene der für R<sub>1</sub> bis R<sub>4</sub> und X oder Y angegebenen Restgruppen substituiert ist, sowie Gemische verschiedener dieser Verbindungen, die zum Beispiel zu einem auf die jeweils zu therapierende Erkrankung und/oder des Patienten auf Basis von diagnostischen oder Daten über den Behandlungserfolg oder -verlauf abgestimmten "personalisierten" Medikament verarbeitet werden können. Unter einem Derivat wird auch eine Verbindung der Sorbicillacton-A-Klasse verstanden, die aus anderen (z.B.) marinen Organismen isoliert werden kann, als den hier (beispielhaft) erwähnten.



8



Die vorliegende Erfindung soll nun im weiteren durch die folgenden Beispiele in Bezug auf die beiliegenden Abbildungen beschrieben werden, ohne jedoch darauf beschränkt zu werden. Es zeigt

Figur 1 den Einfluß von Sorbicillacton A auf den intrazellulären Kalziumspiegel von neuronalen Zellen.

Figur 1A zeigt die Behandlung von Neuronen mit 200  $\mu\text{M}$  L-Glutaminsäure (L-Glu) und 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\bullet$ ), wobei die Neuronen, die mit 10  $\mu\text{g/mL}$  Sorbicillacton A ( $\circ$ ) behandelt wurden, 5 min vor Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  L-Glu und 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (zum Zeitpunkt 10 min) präinkubiert wurden. Die Änderungskinetik wurde kontinuierlich über etwa 20 min gemessen. Es wurden sowohl Mittelwert ( $n = 19$ ) als auch Standardabweichung ( $\pm \text{SE}$ ) ermittelt.

Figur 1B zeigt die Behandlung von Neuronen mit 200  $\mu\text{M}$  Serotonin (5-HT) und 2,5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\bullet$ ), wobei die Neuronen, die mit 10  $\mu\text{g/mL}$  Sorbicillacton A ( $\circ$ ) behandelt wurden, 5 min vor Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  5-HT und 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  (zum Zeitpunkt 10 min) präinkubiert wurden. Die Änderungskinetik wurde kontinuierlich über etwa 20 min gemessen. Es wurden sowohl Mittelwert ( $n = 21$ ) als auch Standardabweichung ( $\pm \text{SE}$ ) ermittelt.

Figur 2 die Ergebnisse des "Comet-Assay" nach der Inkubation von L5178Y-Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) mit 1, 3 und 10  $\mu\text{g/mL}$  Sorbicillacton A. Figur 2A zeigt die Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit. Figur 2B zeigt die Ergebnisse nach 24 Stunden Inkubationszeit. Es wurden jeweils der Mittelwert (A:  $n = 25$ , B:  $n = 29$ ) und die Standardabweichung ( $\pm \text{SD}$ ) ermittelt.

Figur 3 die Ergebnisse des "Fast Microassay" nach der Inkubation von L5178Y-Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) mit 1, 3, 10 und 30 µg/mL Sorbicillacton A. Figur 3A zeigt die Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit. Figur 3B zeigt die Ergebnisse nach 24 Stunden Inkubationszeit. Es wurden jeweils der Mittelwert (A: n = 5, B: n = 7) und die Standardabweichung ( $\pm$  SD) ermittelt.

**Beispiel 1: Kultivierung des Pilzes *Penicillium chrysogenum* in salzhaltigen Medien zur optimierten Produktion von Sorbicillacton A**

Zur Optimierung der Produktion von Sorbicillacton A wurden Medien und Kulturbedingungen etabliert, die sich von den sonst üblichen unterscheiden, u.a. dadurch, daß bei erhöhten Salzgehalten und Temperaturen, die für diesen Organismus ungewöhnlich sind, kultiviert wird.

Als Inokulum für die Anzucht werden unter Standardbedingungen erstellte Sporensuspensionen verwendet, die zunächst auf Agarplatten mit Wickerham Medium mit 1,5 % Bactoagar bei Raumtemperatur für 14 Tage angezogen werden. Die Sporen werden in einer Lösung von Meerwasser (34‰) und Glycerin (2:1) suspendiert, auf einen Standardtiter eingestellt, portioniert und in geeigneten Portionen eingefroren und bei -20°C gelagert. Das Animpfgut für große Ansätze von Massenkulturen wird hergestellt, indem Getreidekörner durch Autoklavieren sterilisiert, mit Medium versetzt und mit Pilzsporen beimpft werden. Nach Inkubationszeit von 14 Tagen bei 20°C werden die Körner getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Mit diesen Sporenpräparationen werden die Kulturmedien angeimpft.

Für die Produktion wird eine modifizierte Version des Wickerham'schen Mediums in der folgenden Zusammensetzung verwendet: 3 g Hefeextrakt, 6 g Malzextrakt, 5 g Pepton, 10 g Glukose, 25 g NaCl in 1000 mL aqua dest. Der pH-Wert wird auf 5.5 eingestellt.

Das Medium wird in Kulturgefäßen mit einer Füllhöhe von 4 cm gegeben, autoklaviert (20 min. bei 121°C), nach Abkühlen mit Sporensuspension beimpft und für 7 Tage bei 22°C bis zur Ausbildung eines kompakten Oberflächenmycels inkubiert. Dann wird die

Temperatur auf 31°C erhöht und für weitere 7 Tage inkubiert. Dann wird die Kulturflüssigkeit, die den überwiegenden Anteil des produzierten Sorbicillactons (1) enthält vom Mycel getrennt und zur Substanzgewinnung weiter aufbereitet. Das Mycel wird erneut mit der gleichen Menge an frischem Medium etwas veränderter Zusammensetzung unterschichtet. Verwendet wird das Medium, wie oben aufgeführt, jedoch mit 5 g NaCl, 15 g Glucose pro Liter und ohne Malzextrakt. Das Medium wird vor dem Befüllen auf Inkubationstemperatur aufgewärmt und die Mycelien werden für 5 Tage inkubiert. Danach wird die gleiche Prozedur wiederholt. Sorbicillacton A (1) wird aus den Kulturflüssigkeiten und den Mycelien nach getrennten Verfahren extrahiert.

**Beispiel 2: Extraktion von Sorbicillacton A aus der Pilzbiomasse**

Das Pilzmycel wird vom Kulturmedium durch ein feinmaschiges Netz getrennt, mit 3 mL Ethylacetat je Gramm Biomasse versetzt und extrahiert. Die Extrakte werden filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Konzentrat wird bei 5°C bzw. -20°C bis zur weiteren Aufreinigung gelagert.

**Beispiel 3: Extraktion von Sorbicillacton A aus dem Kulturmedium**

Zu dem vom Mycel getrennten Kulturmedium werden je Liter 100 g eines Austauscherharzes, z.B. XAD-16, unter leichtem Rühren zugegeben. Das XAD-16 wird nach dem Beladen mit den Substanzen aus dem Medium abfiltriert und nacheinander mit Methanol/Wasser (1:1) und Methanol extrahiert. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und das methanolfreie Konzentrat wird bei 5°C bzw. -20°C bis zur weiteren Aufreinigung gelagert.

**Beispiel 4: Bestimmung des Gehaltes an Sorbicillacton A durch HPLC-UV**

Die Gehaltsbestimmung erfolgt auf einer analytischen HPLC mit Diodenarray-Detektor (Gradient: 80 % A : 20 % B auf 20 % A : 80 % B in 20 min. mit A = Wasser + 0.05 % TFA und B = Acetonitril + 0.05 % TFA) an einer Waters Symmetry-C-18 reversed-phase-Säule bei einem Fluß von 0.4 mL / min. Die Integration der Peakfläche wird bei

einer Wellenlänge von 370 nm durchgeführt, da die Absorption von Dihydrosorbicillacton A (3) bei dieser Wellenlänge praktisch gleich null ist, und somit der Fehler bei der Gehaltsbestimmung minimiert wird. Die Bestimmung der Konzentration in den Rohextrakten erfolgt durch Verdünnung des jeweiligen Extraktes mit einem Methanol- / Wassergemisch (1:1) um den Faktor 150, bei den Extrakten der verschiedenen Aufreinigungsstufen bei einer Verdünnung um den Faktor 10. Die Bestimmung des Gehaltes an Sorbicillacton A (2) sowohl in den Rohextrakten als auch in den einzelnen Extrakten der verschiedenen Aufreinigungsstufen geschieht mit Hilfe einer Eichgerade aus Messungen mit Proben verschieden konzentrierter Lösungen von Sorbicillacton A (2) in Methanol.

**Beispiel 5: Aufreinigung des aus dem Kulturmedium gewonnenen Rohextraktes**

Der wässrige Rohextrakt der Pilzkulturen von *Penicillium chrysogenum* wird zur Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte, wie zum Beispiel Meleagrin, mit Ethylacetat neutral extrahiert. Die erhaltene Ethylacetat-Phase wird verworfen. Die wässrige Phase wird mit Phosphorsäure angesäuert (pH = 2) und mit Ethylacetat erschöpfend extrahiert. Sorbicillacton A kann praktisch quantitativ in die Ethylacetat-Phase der sauren Extraktion überführt werden. Der gewonnene Extrakt enthält nach Einengen im Vakuum bereits einen Massengehalt von bis zu 50 % Sorbicillacton A.

**Beispiel 6: Weitere Aufreinigung des Extraktes durch Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC)**

Die weitere Aufreinigung des Extraktes erfolgt mit einem zusätzlichen flüssig-flüssig-chromatographischen Schritt. Dabei kommt die neuartige Methode der so genannten Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC) zur Anwendung. Bei dieser Methode wird, wie bei gängigen flüssig-flüssig-chromatographischen Methoden, wie zum Beispiel der High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC), ein 2-phaseses Lösungsmittelgemisch eingesetzt. Dabei kann wahlweise die obere oder die untere Phase als stationäre Phase verwendet werden. Anders als bei der HSCCC wird bei der FCPC nicht mit einer Kapillarspule, sondern mit einem mit mehreren hundert

Trennkammern versehenen Rotor gearbeitet. In diesen direkt hintereinander geschalteten Kammern findet die Verteilung der im Extrakt enthaltenen Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase statt.

Das System wird während der Trennung in schnelle Rotation versetzt (1200-1400 rpm). Dadurch wird zum einen, je nach Durchflußrichtung, die gewünschte Phase im Rotor der FCPC zurückgehalten und zum anderen die Trennung der beiden Phasen durch die Zentrifugalkraft beschleunigt. Dies ermöglicht die Verwendung großer Flußgeschwindigkeiten und somit den Durchsatz großer Substanzmengen in kurzer Zeit. Der Verteilungskoeffizient  $K$  der gewünschten Substanz zwischen den beiden Phasen sollte im Bereich zwischen 0,7 und 4,5 liegen. Bei kleinerem  $K$  eluiert die Substanz zu schnell, so daß keinerlei Trennung erfolgt. Bei höherem  $K$  hingegen wird die Retentionszeit für die schnelle Aufreinigung großer Mengen Extrakt zu lang.

Im Fall von Sorbicillacton A ist die Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus Heptan/Ethylacetat/Methanol/Wasser (42 % / 58 % / 42 % / 58 %) bei einem Fluß von 6 bis 7 mL pro min., einer Umdrehungszahl von 1200 rpm und der Verwendung der oberen Phase als stationärer Phase besonders vorteilhaft. Pro Liter Lösungsmittelgemisch wird außerdem 1 mL konzentrierte Phosphorsäure zugesetzt. Bei Verwendung eines 200 mL fassenden FCPC-Rotors ist eine Aufreinigung von bis zu 1,5 g Extrakt pro Lauf möglich. Pro Trennung werden mit diesen Einstellungen inklusive Vorbereitungs- und Spülzeiten lediglich 90 min benötigt. Die Sorbicillacton A enthaltenden Fraktionen werden von den organischen Lösungsmitteln befreit und die zurückbleibende, wässrig-saure Phase erschöpfend mit Ethylacetat extrahiert. Nach Einengen im Vakuum erhält man Extrakte mit einem Massengehalt an Sorbicillacton A von bis zu 70 %.

#### **Beispiel 7: Gewinnung von reinem Sorbicillacton A mittels Gelchromatographie**

Der bei der Gewinnung von reinem Sorbicillacton A (2) schwierigste Schritt ist die Abtrennung der strukturell sehr ähnlichen, aber um das Fünffache weniger aktiven Verbindung Dihydrosorbicillacton A (3).

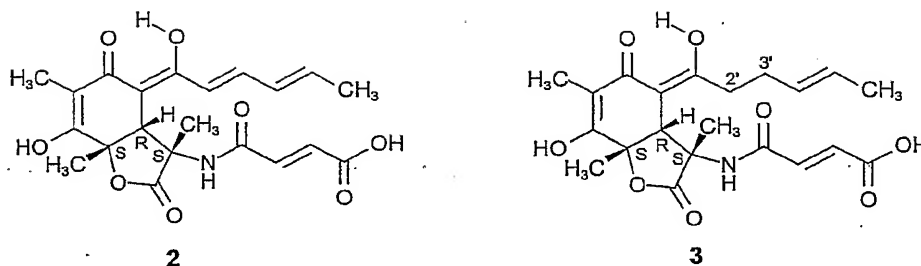


Abb. 1. Strukturen von Sorbicillacton A (**2**) und Dihydrosorbicillacton A (**3**)

Aufgrund der Tatsache, daß sich die beiden Verbindungen lediglich im Sättigungsgrad an C-2' und C-3' in der Sorbylseitenkette unterscheiden, sind die physikalischen Eigenschaften der Moleküle, wie Masse oder Polarität, die man sich bei der Trennung von Substanzgemischen zu Nutze macht, nahezu identisch. Die Trennung kann aber durch Gelchromatographie an Sephadex-LH-20-Material mit Methanol als Eluent realisiert werden. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Moleküle ist jedoch die Verwendung eines sehr langen Säulensystems (größer oder gleich 6 m) nötig. Dieses Säulensystem wird als MPLC-System über eine Pumpe mit Lösungsmittel versorgt. Die Flußgeschwindigkeit des Eluenten beträgt ca. 10 mL pro min. Die beiden Lactone **2** und **3** werden dabei in ausreichender Weise voneinander getrennt, wobei **3** schneller eluiert. Man erhält pro Trennungsgang ca. 70 % des aufgetragenen, verunreinigten Sorbicillacton A (**2**) in sauberen Fraktionen. Die mit **3** verunreinigten Mischfraktionen können durch erneute Chromatographie an Sephadex LH-20 problemlos nachgereinigt werden.

#### **Beispiel 8: Bestimmung des prozentualen Verhältnisses von Sorbicillacton A (**2**) und Dihydrosorbicillacton A (**3**) in den Extrakten durch HPLC-UV**

Zur Bestimmung des prozentualen Verhältnisses von Sorbicillacton A (**2**) und Dihydrosorbicillacton A (**3**) in den Rohextrakten wird zunächst eine Probe des Extraktes mit einem Methanol/Wassergemisch verdünnt. Die Probe wird an einer analytischen HPLC mit Diodenarray-Detektor unter isokratischen Bedingungen (Wasser / Acetonitril / TFA = 70/30/0,05 %) an einer Waters Symmetry-C-18 reversed-phase-Säule bei einem Fluß von 0,4 mL/min untersucht. Man erzielt so eine für die Integration der Peakflächen

der Verbindungen ausreichende Trennung. Die Integration der Peakflächen wird dabei bei einer Wellenlänge von 220 nm durchgeführt, da die Absorption der beiden Lactone (2, 3) bei dieser Wellenlänge etwa gleich stark ist. Diese Methode kann auch zur Untersuchung der Reinheit der Fraktionen aus der Gelchromatographie herangezogen werden.

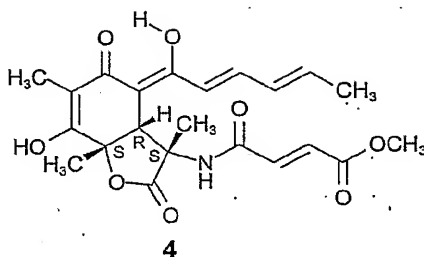
#### **Beispiel 9: Bestimmung der Reinheit der Fraktionen aus der Gelchromatographie mittels UV-Absorptionsexperimenten**

Zur Beschleunigung der Analytik der Fraktionen aus dem letzten Aufreinigungsschritt wurde nach einer Methode gesucht, die ohne chromatographische Verfahren auskommt. Dabei erwies es sich als praktikabel, die UV-Absorption der entsprechenden Fraktionen sowohl bei 300 nm als auch bei 430 nm aufzunehmen und den Quotient aus den beiden Messwerten zur Überprüfung der Reinheit heranzuziehen. Die unerwünschte Verunreinigung Dihydrosorbicillacton A (3) eluiert vor Sorbicillacton A (2) und absorbiert, wie auch Sorbicillacton A (2), bei 300 nm stark, bei einer Wellenlänge von 430 nm aber praktisch nicht. Bei Erreichen eines konstanten Quotienten aus den beiden Messwerten kann also davon ausgegangen werden, daß die Fraktionen lediglich sauberes Sorbicillacton A (2) enthalten. Diese Ergebnisse konnten durch Kontrollmessungen unter den bei Beispiel 8 beschriebenen Bedingungen bestätigt werden. Die Messzeit für die Analytik aller Fraktionen einer Trennung kann so von mehreren Stunden bei der HPLC-Analytik auf nur wenige Minuten reduziert werden.

#### **Beispiel 10: Derivatisierung von Sorbicillacton A (2) zum Methylester 4**

Die Derivatisierung von Sorbicillacton A (2) zum Methylester 4 war zum einem interessant, da sich die Verbindung als interner Standard zur Bestimmung der Konzentration in z. B. Blutserum eignet, zum anderen zur Betrachtung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen. In 5 mL Methanol wurden 30 mg Sorbicillacton A (2) gelöst und mit 200 µL konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Nach 6 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurden 100 mL Wasser zugegeben und das Gemisch zweimal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Eindampfen der organischen Phasen im Vakuum

wurde der Rückstand durch präparative HPLC aufgereinigt. Man erhielt so 18,6 mg einer gelben amorphen Substanz.



Physikalische und spektroskopische Daten von Sorbicillacton-A-methylester (**4**):

Die Verbindung liegt als gelber amorpher Feststoff vor.

Schmp. 166-170 °C (THF).

$[\alpha]_D^{20} = -558^\circ$  ( $c = 0,2$  in Methanol).

CD ( $c = 0.2$  in Methanol):  $\Delta\epsilon_{208} +11.1$ ,  $\Delta\epsilon_{231} -12.6$ ,  $\Delta\epsilon_{278} +12.5$ ,  $\Delta\epsilon_{370} -13.0$ .

IR (KBr):  $\nu = 3333$  (br.), 2931 (w), 1783 (m), 1730 (m), 1681 (s), 1612 (s), 1552 (s), 1442 (m), 1415 (m), 1384 (m), 1350 (s), 1310 (s), 1198 (m), 1176 (m), 1065 (m)  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (ESI, positiv):  $m/z$  432  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Tabelle 1. NMR-Daten von Sorbicillacton-A-methylester (**1**) in THF- $d_8$

Position	$^{13}\text{C}$ [ppm]	$^1\text{H}$ [ppm]	HMBC
----------	-----------------------	--------------------	------



1	99.5		
2	192.0		
3	110.8		
4	166.7		
5	81.1		
6	53.2	3.47 <i>s</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'
7	~23.5	1.55 <i>s</i>	4, 5, 6
8	7.3	1.52 <i>s</i>	2, 3, 4
9	60.0		
10	173.0		
11	~26.0	1.42 <i>s</i>	6, 9, 10
1'	169.7		
2'	121.7	6.39 <i>d</i>	1', 3', 4'
3'	139.1	7.20 <i>dd</i>	1', 3', 5'
4'	131.9	6.28 <i>ddd</i>	2', 6'
5'	137.0	6.09 <i>m</i>	3', 6'
6'	18.6	1.82 <i>dd</i>	4', 5'
1''	162.3		
2''	136.3	6.71 <i>d</i>	1'', 3'', 4''
3''	130.3	6.52 <i>d</i>	1'', 4''
4''	165.9		
COOMe	51.8	3.69 <i>s</i>	4''
1'-OH		16.60 <i>bs</i>	
NH		7.66 <i>s</i>	9, 10, 11, 1''

### Beispiel 11: Nachweis der Bioaktivität von Sorbicillacton A

#### A) Messungen

**Material:** Es wurden die gleichen Materialien, wie in Perovic et al. (1998, Mech. Ageing Dev. 101:1–19) beschrieben, verwendet. Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) wurde von Molecular Probes (Leiden, Niederlande), „Dulbecco's modified Eagle's Medium“ mit 4,5 g/L Glucose (DMEM/HG), L-Glutaminsäure (L-Glu) und Serotonin (5-HT) von Sigma-

Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und die Antikörper Mäuse-Anti-Neurofilament (68 kDa) und Mäuse-Anti-Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bezogen. Es wurde Sorbicillacton A der Charge: 2208/2a verwendet.

**Primäre Neuronen:** Die kortikale Zellkultur wurde aus den Gehirnen von 17–18 Tage alten Rattenembryonen nach einer modifizierten Prozedur erstellt [Freshney (1987) Culture of specific cell types. In: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, A.R. Liss, New York, S. 257–288; Perovic et al. (1994) Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharmacol. Sec.) 288:27–33]. Nach der Isolierung wurden die Cerebral-Hemisphären in „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gelegt und anschließend die neuronalen Zellen in HBSS mit Hilfe von 0,025 % (w/v) Trypsin (10 min.; 37°C) dissoziiert. Die proteolytische Reaktion wurde mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) abgebrochen. Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert und das resultierende Pellet in „Dulbecco's modified Eagles's Medium“ mit 4,5 g/L Glucose (DMEM/HG) (enthält 2 mM L-Glutamin, 100 mU/L Insulin und 10 % (v/v) FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden in eine mit Poly-L-Lysin (5 µg/mL, 300 µl/cm<sup>2</sup>) beschichtete Kammer mit einer Zelldichte von  $2,0 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausplattiert. Nach zwei Tagen wurde das DMEM/HG/10%-FKS-Medium entfernt und durch DMEM/HG/serumfreies Medium ersetzt. Zwei Wochen nach der Isolierung erfolgte die Immunfärbung mit Anti-Neurofilament (68 kDa) als Marker für Neuronen und Anti-GFAP als Marker für Gliazellen. Die Kulturen beinhalteten > 80 % Neuronen; die restlichen 20 % waren GFAP-positive Zellen, hauptsächlich Astrozyten (Ushijima et al. (1995) Eur. J. Neurosci. 7:1353–9). Die Neuronen wurden in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C gehalten.

**Laden von Neuronen mit Fura-2-AM:** Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) wurde durch Fluoreszenzmessungen bestimmt. Ausschlaggebend war das Verhältnis der Absorption des  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatorfarbstoffes Fura-2-AM bei 340 und 380 nm (Grynkiewicz et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:3440–50). Die Neuronen wurden mit 6 µM

Fura-2-AM in DMEM/HG/serumfreiem Medium (versetzt mit 1 % (w/v) bovinem Serumalbumin) bei 37°C für 60 min beladen. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und weitere 45 min lang bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationszeit ist ausreichend, um die Neuronen zu beladen (inaktives Fura-2-AM) und den Acetoxymethylester (aktives Fura-2) zu hydrolysieren.

**Kalzium-Kalibrierungskurve:** Eine Kalzium-Kalibrierungskurve wurde nach den Methoden von Grynkiewicz et al. (1985, J. Biol. Chem. 260:3440–50) erstellt. Fluoreszenzbilder wurden für jeden Puffer bei 340 und 380 nm erhalten. Der Quotient aus den beiden Fluoreszenzspektren (340/380 nm) wurde berechnet und als Kalibrierungskurve dargestellt. Der Quotient (340/380 nm [Ratio-Wert]) von 1,0 entspricht 228 nM  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Änderungen des Kalziumspiegels in Neuronen:** In allen Versuchsansätzen wurden die Zellen zuerst mit Fura-2-AM beladen und anschließend mit unterschiedlichen Substanzen (in Locke's Lösung; 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,6 mM  $NaHCO_3$ ; 5,6 mM Glucose and 10 mM Hepes; pH 7,4; ohne  $CaCl_2$ ) stimuliert. Sorbicillacton A wurde mit einer Konzentration von 10 mg/mL in 100 % (v/v) DMSO gelöst und bei -20°C gelagert. Neuronen wurden im ersten Ansatz 5 min mit 0,1 % (v/v) DMSO (Kontrolle) stimuliert; nach 10 min wurden 200  $\mu$ M L-Glutaminsäure (L-Glu), 200  $\mu$ M Serotonin (5-HT) und 2,5 mM  $CaCl_2$  zu den Zellen gegeben. Im zweiten Ansatz wurde die Auswirkung von L-Glu, 5-HT und 2,5 mM  $CaCl_2$  auf den Kalziumspiegel vorinkubierter Neuronen (jeweils 5 min mit 10  $\mu$ g/mL Sorbicillacton A) getestet. Der  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel wurde in allen Experimenten mindestens 20–25 min lang gemessen.

Zur Bestimmung des  $[Ca^{2+}]_i$  wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Borsilikat-Deckgläsern im 4-Kammer-System (Lab-Tek® Chamber Slide™ System; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert. Mit einem „inverted-stage“-Mikroskop (Olympus IX70) mit apochromatisch reflektiertem Licht und dem Fluoreszenzobjektiv UApo40X/340 wurden die Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Zellen wurden alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm mit Hilfe eines computergesteuerten Schmalband-Interferenzfilters vor einer 100-W-Xenon-Lampe beleuchtet. Zusätzlich wurde bei 380 nm ein 0,25-ND-Filter benutzt. Die

Fluoreszenzemissionen bei 510 nm wurden mit einer CCD-Kamera (Modell C2400-87; Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgezeichnet. Die Bilder wurden computergestützt mit dem Imaging-System Argus 50, Hamamatsu, als 256 x 256 Pixel mit 8-bit-Arrays digitalisiert. Der Fluoreszenzquotient 340/380 nm wurde durch Division der Bilderpaare ermittelt.

**Statistik:** Die Ergebnisse wurden mittels des gepaarten „Student's t-test“ (Sachs (1984) Angewandte Statistik. Springer, Berlin) ausgewertet.

## **B) Ergebnisse**

**Einfluß von Sorbicillacton A auf den  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in neuronalen Zellen:** Die Zugabe von 10 µg/mL Sorbicillacton A zeigte fast keinen Effekt auf  $[Ca^{2+}]_i$  in neuronalen Zellen.

**Einfluß von L-Glutaminsäure auf  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in An- oder Abwesenheit von Sorbicillacton A in neuronalen Zellen:** Inkubation der Zellen mit 200 µM L-Glutaminsäure und 2,5 mM  $Ca^{2+}$  (Figur 1A) ergab einen starken Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach 10 min. Am Ende der Messung stiegen die 340-/380-nm-Werte um  $1,715 \pm 0,081$  (307,1 %). Die Kontrolle wurde dabei als 100% angenommen. Eine Präinkubation der Neuronen mit 10 µg/mL Sorbicillacton A bewirkte einen Abfall des  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegels nach der Zugabe von 200 µM L-Glu und 2,5 mM  $CaCl_2$ . Der Abfall im  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel war signifikant und betrug 46,7 % bei 10 µg/mL ( $p < 0,001$ , Figur 1A).

**Einfluß von Serotonin auf  $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in An- oder Abwesenheit von Sorbicillacton A in neuronalen Zellen:** Zugabe von 200 µM Serotonin (5-HT) und 2,5 mM  $Ca^{2+}$  zu den Zellen (Figur 1B) ergab einen starken Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  nach 10 min. Die 340-/380-nm-Werte stiegen um  $0,971 \pm 0,112$  (219,9 %). Die Kontrolle wurde dabei als 100 % angenommen. Die Abnahme der freien Kalziumkonzentration in Neuronen nach Präinkubation mit 10 µg/mL Sorbicillacton A und anschließender Inkubation mit 200 µM von 5-HT war signifikant; im Vergleich zur Kontrolle waren die Werte um 77,6 % (Figur 1B) gesunken.

### C) Schlußfolgerung

Es wurde gefunden, daß Zellen, die mit Sorbicillacton A inkubiert wurden, nach Zugabe von L-Glutaminsäure und Serotonin (5-HT) einen starken Abfall des intrazellulären Kalziumspiegels zeigten. L-Glutaminsäure und Serotonin sind als Neurotransmitter in einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen etiologisch involviert. Aufgrund dieser Eigenschaften kann Sorbicillacton A in der Behandlung der genannten Erkrankungen und der damit verbundenen Symptom-Komplexe verwendet werden.

### Beispiel 12: Nachweis der Genotoxizität von Sorbicillacton A: „Comet-Assay“

**Material:** „Normal Melting Agarose“ (NMA, Kat.-Nr. 840041) und „Low Melting Agarose“ (LMA, Kat.-Nr. 870081) wurden von Biozym (Hamburg, Deutschland), Triton x-100 von Fluka (Buchs SG, Schweiz), RPMI1640-Medium, DMSO und EDTA von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), NaCl und Tris von Roth (Karsruhe, Deutschland) sowie fötales Kälberserum (FKS) von Gibco (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Es wurde Sorbicillacton A der Charge: 2208/2a verwendet.

**Zellen:** Die Genotoxizität von Sorbicillacton A wurde an L5178Y Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) getestet. Wie beschrieben (Müller et al., 1979, Cancer Res. 39:1102-1107) wurden die Zellen in RPMI1640-Medium mit 10 mM Hepes, dem 10 % fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt worden war, kultiviert. Als Inokulumskonzentration wurde  $10^4$  Zellen/mL gewählt. Die Zellen wurden mit 1, 3 und 10 µg/mL Sorbicillacton A 4 und 24 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem „Comet-Assay“ untersucht.

**Alkalische Elektrophorese:** Die Objektträger (Superfrost) wurden mit Aceton gereinigt. 1,0-prozentige „Normal Melting Agarose“ (NMA) in 1 x PBS wurde aufgekocht und anschließend wurden etwa 600 µl Agarose auf einen Objektträger aufgetragen. Die Objektträger wurden kurz (~ 5 min) bei 50°C getrocknet und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurde die 0,7-prozentige „Low Melting Agarose“ (LMA) in destilliertem Wasser zubereitet. Die zweite Schicht auf den Objektträgern

bestand aus 200 µl LMA. Die Objektträger wurden bei 4°C 10 min lang inkubiert. Die 3. Schicht bestand aus 10 µl Zellsuspension ( $7 \times 10^4$  Zellen/mL) plus 60 µl LMA. Nach Inkubation mit Sorbicillacton A wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und bei 800 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellzahl wurde auf  $7 \times 10^4$  Zellen/mL verdünnt. Nach dem Auftragen wurden die Objektträger 4°C 10 min lang inkubiert. Vor der Zell-Lyse wurde die letzte LMA-Schicht (~ 100 µl) aufgetragen. Die Lyse der Zellen erfolgte im Dunkeln durch Inkubation in Lyselösung (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2,5 M NaCl; pH = 10) mit 10 % (v/v) DMSO und 1 % (v/v) Triton x-100 für 1 Stunde bei 4°C. Die Objektträger wurden direkt aus der Lyse in die Elektrophorese-Kammer überführt und für 20 min im Elektrophorese-Puffer (30 mM NaOH, 1 mM EDTA; pH 13,8) inkubiert. Die Elektrophorese wurde konstant auf 0,75 V/cm (~ 300 mA) eingestellt, und unter Eiskühlung für 30 min durchgeführt. Zur Neutralisierung wurden die Objektträger 5 min mit Neutralisierungspuffer (400 mM Tris; pH 7,5) bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend 5 min. mit 95 % Ethanol entwässert und im Dunkeln luftgetrocknet. Die Objektträger wurden mit 60 µl Ethidiumbromid-Lösung (20 µg/mL dest. Wasser) angefärbt, photographiert und ausgewertet. Die Werte sind als „Extent tail moment“ angegeben (Bihari et al., 2002, Croatica Chemica Acta 75:793-804; Müller et al., 1979, Cancer Res. 39:1102-1107). Ein großer Zahlenwert deutet daher auf eine hohe Desintegration der DNS in den Zellen hin. Bei normalen Zellen ergeben sich Werte um 0.

**Ergebnisse:** Die Inkubation der L5178Y-Zellen mit 1, 3 und 10 µg/mL Sorbicillacton A zeigte nach 4 Stunden (Figur 2A) keine signifikanten Änderung des „Extent tail moment“. Bei diesen Konzentrationen induziert Sorbicillacton A keine DNS-Strangbrüche. Auch nach 24 Stunden Inkubation mit Sorbicillacton A konnten keine signifikanten Änderungen des „Extent tail moment“ bei L5178Y-Zellen festgestellt werden (Figur 2B).

**Schlußfolgerung:** Es wurde gefunden, daß Zellen, die mit Sorbicillacton A inkubiert wurden, nach der Zugabe von 1, 3 und 10 µg/mL keinen signifikanten Anstieg des „Extent tail moment“ zeigten.

**Beispiel 13: Nachweis der Genotoxizität von Sorbicillacton A: „Fast Microassay“**

**Material:** PicoGreen wurde von Molecular Probes (Leiden, Niederlande), RPMI1640-Medium von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland); fötales Kälberserum (FKS) von Gibco (Karlsruhe, Deutschland) und schwarze Mikrotiterplatten (96-Well-Platten) von Nunc (Wiesbaden, Deutschland) bezogen. Es wurde Sorbicillacton A der Charge: 2208/2a verwendet.

**Zellen:** Die Genotoxizität von Sorbicillacton A wurde an L5178Y Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) getestet. Wie beschrieben (Müller et al., 1979, Cancer Res. 39:1102-1107) wurden die Zellen in RPMI1640-Medium, dem 10 % fötales Kälberserum (FKS) zugesetzt worden war, kultiviert. Als Inokulumskonzentration wurde  $10^4$  Zellen/mL gewählt. Die Zellen wurden mit 1, 3, 10 und 30 µg/mL Sorbicillacton A (1) 4 und 24 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit dem "Fast Microassay" untersucht.

**„Fast Microassay“:** Die Methode wurde nach einer modifizierten Methode durchgeführt (Batel et al., 1999, Anal. Biochem., 270:195-200). Die Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 1 x PBS aufgenommen und auf  $10^4$  Zellen/mL verdünnt. In schwarze Mikrotiterplatten (96-Well-Platten, Nunc, Wiesbaden) wurden je 25 µl der Zellsuspension (etwa  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Well) vorpipetiert. In den Kontrollen befand sich 25 µl 1 x PBS. Danach wurden 25 µl Lyselösung (7 M Harnstoff, 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 M EDTA, pH = 10,0) mit PicoGreen (20 µl konz. PicoGreen pro 1 mL Lyselösung) in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden die Zellen 40 min lang im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert. Nach der Inkubation erfolgt die Denaturierung (Entwindung) der DNS durch Zugabe der frisch hergestellten alkalischen Lösung. Diese wird hergestellt, indem 20 mL 20 mM EDTA und 32 mL 20 mM EDTA/100 mM NaOH auf einen pH-Wert von 12,3 eingestellt werden. Die Messung erfolgte sofort in einem Fluorocan bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm, alle 3 bis 5 min, insgesamt 20 min. lang. Die Ergebnisse wurden als „Strand Scission Factors“ (Strangbruch-Faktoren, SSF)

angegeben und nach einer Denaturierungszeit (Entwindungszeit) von 20 min nach der folgenden Gleichung berechnet:  $SSF = \log (\% \text{ dsDNS-Probe} / \% \text{ dsDNS-Kontrolle})$ .

**Ergebnisse: Einfluß von Sorbicillacton A auf den SSF-Wert in L5178Y-Zellen:** Die Zugabe von 1, 3, 10 und 30 µg/mL von Sorbicillacton A zeigte fast keinen Effekt auf die SSF-Werte in L5178Y-Zellen nach 4 Stunden Inkubation (Figur 3A).

Ein signifikanter Anstieg der SSF-Werte (Anteil an DNS-Strangbrüchen) wurde nach 24 Stunden bei Zugabe von 3 und 30 µg/mL ( $p < 0,001$ ) Sorbicillacton A beobachtet (Figur 3B). Inkubation der L5178Y-Zellen mit 1 bis 10 µg/mL Sorbicillacton A zeigte einen leichten, aber keinen signifikanten Anstieg der SSF-Werte.

**Schlußfolgerung:** Sorbicillacton A induziert in L5178Y-Zellen nach 24 Stunden Inkubation bei einer Konzentration von 30 µg/mL DNS-Strangbrüche. Aufgrund dieser Eigenschaften kann Sorbicillacton A in der Behandlung von Leukämie angewendet werden.

#### **Beispiel 14: Nachweis der durch Sorbicillacton A ausgelösten Apoptose (Cell Death Detection ELISA plus)**

**Material:** RPMI1640-Medium, HEPES gepuffert, wurde von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), fötales Kälberserum (FCS) von Gibco (Karlsruhe, Deutschland) und Cell Death Detection ELISA plus von Roche (Mannheim, Deutschland, Cat.No. 1774425) bezogen. Es wurde Sorbicillacton A der Charge: 2208/2a verwendet.

**Inkubation und Aufarbeitung der Zellen:** Die L5178Y- Mäuselymphomazellen (ATCC CRL 1722) wurden gezählt und auf eine Zellzahl von  $10^4$  Zellen/mL eingestellt. Die Sorbicillacton-A- und Dihydrosorbicillacton-A-Stammlösung (10 mg/mL in DMSO) wurde mit Medium (RPMI/HEPES mit 10 % FCS) auf Konzentrationen von 60, 20 und 6 µg/mL verdünnt. In einer 96-Well-Kulturplatte wurden zu je 100 µl der verschiedenen Dihydrosorbicillacton-A- und Sorbicillacton-A-Lösungen je 100 µl Zellsuspension ( $\sim 10^3$  Zellen) pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde RPMI1640-Medium ohne



Dihydrosorbicillacton und Sorbicillacton A verwendet. Die Endkonzentrationen betrugen 30, 10 und 3 µg/mL Sorbicillacton A und Dihydrosorbicillacton A. Es wurden je vier Parallelansätze untersucht. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Kulturplatte bei 200 x g (~ 1200 rpm) 10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen wurden mit je 200 µl Lysis-Puffer (Roche-Kit) überschichtet. Anschließend wurden sie 30 min lang bei Raumtemperatur lysiert. Nach der Lyse wurde die Kulturplatte erneut bei 200 x g (~ 1200 rpm) 10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert.

**ELISA:** Der Streptavidin-ELISA-Platte des Roche-Kits wurden zwei Strips mit je acht „Wells“ entnommen. In jedes „Well“ wurden 20 µl des Überstandes einer Zell-Lyse (siehe oben) gegeben. Dabei wurden die Proben mit 30 bzw 10 µg/mL Sorbicillacton A und Dihydrosorbicillacton A als 4-fach, alle anderen als Doppelbestimmungen aufgetragen. Zusätzlich zu diesen Proben wurde eine Positiv-Kontrolle (DNS-Histon-Komplex) aufgetragen. In jedes „Well“ wurden dann 80 µl Immunreagenz gegeben. Diese Lösung setzte sich aus Inkubationspuffer, Anti-Histon-Biotin und Anti-DNS-Peroxidase zusammen. Als Leerwert wurde der Inkubationspuffer verwendet. Die ELISA-Platte wurde 2 Stunden im Schüttelinkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Überstände vorsichtig entfernt und die „Wells“ 3 x mit je 250 µl Inkubationspuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden in jedes „Well“ 100 µl ABTS-Lösung zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 30 min lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte in einem Multiscan bei einer Emissionswellenlänge von 405 nm.

**Ergebnisse:** Zugabe von 3 µg/mL Sorbicillacton A zu den Zellen (Tabelle 2) ergab nach 4 Stunden Inkubation keinen Anstieg an Apoptose-Zellen. Die Werte 91,2 % liegen im Bereich der Negativ-Kontrolle (= 100%) (Tabelle 2).

**Tabelle 2.**

<i>% der Kontrolle (Negativ)</i>	<i>MW ± SD</i>	<i>Sorbicillacton A</i>
--------------------------------------	----------------	-------------------------

	(OD)	
322,1 %	0,219 ± 0,024	30 µg/mL
283,8 %	0,193 ± 0,010	10 µg/mL
91,2 %	0,062 ± 0,004	3 µg/mL

4.641,2 %	3,156 ± 0,286	Positiv-Kontrolle
-----------	---------------	-------------------

100,0 %	0,068 ± 0,005	Negativ-Kontrolle
---------	---------------	-------------------

Nach der Inkubation (4 Stunden) der L5178Y-Zellen mit 10 und 30 µg/mL Sorbicillacton A stiegen die Werte signifikant auf 283,8 % und 322,1 % ( $p < 0,001$ , Tabelle 2). Die Negativ-Kontrolle wurde dabei als 100% angenommen.

Tabelle 3.

% der Kontrolle (Negativ)	MW ± SD (OD)	<i>Dihydrosorbicillacton A</i>
76,2 %	0,016 ± 0,004	30 µg/mL
61,9 %	0,013 ± 0,002	10 µg/mL
76,2 %	0,016 ± 0,003	3 µg/mL

13.952,4 %	2,930 ± 0,245	Positiv-Kontrolle
------------	---------------	-------------------

100,0 %	0,021 ± 0,002	Negativ-Kontrolle
---------	---------------	-------------------

Die Zugabe von 3, 10 und 30 µg/mL Dihydrosorbicillacton A zeigte nach 4 Stunden Inkubation bei L5178Y-Zellen keine Induktion von Apoptose (Tabelle 3). Die Werte waren unter den Kontrollbereich auf 62 bis 67 % gesunken.

**Schlußfolgerung:** Sorbicillacton A induziert in L5178Y-Zellen nach 4-Stunden-Inkubation bei einer Konzentration von 10 und 30 µg/mL Apoptose. Aufgrund dieser

Eigenschaften kann Sorbicillacton A in der Behandlung von Leukämie verwendet werden. Dihydrosorbicillacton A induziert unter den gewählten experimentellen Bedingungen keine Apoptose bei L5178Y-Zellen.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon, umfassend die Schritte von:

- a) Anzüchten eines Pilzes der Gattung *Penicillium* bei 20-25 °C in einem geeigneten Anzuchtmedium bei einer Salzkonzentration von 2-5 % bis zum Ausbilden eines kompakten Oberflächenmycels,
- b) Erhöhen der Temperatur auf 28-35°C und weiteres Inkubieren für 5-10 Tage,
- c) Abtrennen der Kulturflüssigkeit vom Mycel, und
- d) Extrahieren von Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium, und gegebenenfalls,
- e) Unterschichten des Mycels mit frischem Medium mit einer verringerten Salzkonzentration von 0,5-1,5 % und Inkubieren bei 28-35°C für 3-8 Tage,
- f) Wiederholen von Schritt c) und d), und gegebenenfalls,
- g) Wiederholen der Schritte e) bis f), und
- h) Extrahieren von Sorbicillacton A und Derivaten davon aus dem Kulturmedium und/oder den Mycelien.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem Pilz um *Penicillium chrysogenum* handelt, insbesondere der Stamm KIP 3201.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei verschiedene Additiva den geeigneten Anzuchtmedien zugesetzt werden können, wie z.B. Pyruvat, Glutamat, Prolin, Acetat, Sorbicillin oder andere biosynthetische Vorstufen von Sorbicillacton A.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Produktion im Flachbettverfahren erfolgt.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es sich beim Inokulum um eine Festkörper-gebundene Form des Pilzes handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei es sich bei den Festkörpern, an die der Pilz gebunden ist, um schwimmfähige Festkörper, z.B. Getreidekörner oder Styroporkugeln, handelt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Trägervorrichtung zur Stabilisierung des Oberflächenmycels in den Anzuchtbehälter eingeführt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei es sich bei der Trägervorrichtung um ein Netz handelt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Sorbicillacton A oder Derivate davon aus dem vom Kulturmedium abgetrennten Pilzmycel durch Versetzen mit Ethylacetat extrahiert werden.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei Sorbicillacton A oder Derivate davon aus dem Kulturmedium unmittelbar an einen festen Austauscher gebunden und aus dieser gebundenen Form weiter aufgereinigt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei es sich bei dem festen Austauscher um das Austauschharz Amberlite XAD-16 handelt.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, wobei der beladene feste Austauscher aus dem Medium abfiltriert wird und Sorbicillacton A oder Derivate davon mit organischen Lösungsmitteln eluiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei es sich bei den organischen Lösungsmitteln um Methanol, Ethanol, Ethylacetat, Heptan oder Acetonitril handelt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10-13, wobei Sorbicillacton A oder Derivate davon aus dem Rohextrakt mit organischen Lösungsmitteln sauer extrahiert werden.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Rohextrakt mit Phosphorsäure auf pH 2 gebracht und anschließend mit Ethylacetat extrahiert wird.
16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Aufreinigung der Extrakte mittels FCPC (Fast Centrifugal Partitioning Chromatography) erfolgt.
17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei ein Lösungsmittelgemisch aus Heptan, Ethylacetat, Methanol und Wasser mit einem Zusatz von 1 ml/l konzentrierter Phosphorsäure bei einem Fluß von 6-7 ml/min und einer Umdrehungszahl von 1200 Umdrehungen pro min und wobei die obere als stationäre Phase angewendet wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Aufreinigung der Extrakte durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels erfolgt.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei Sorbicillacton A mit Methanol eluiert wird.
20. Verfahren zur Herstellung von Sorbicillacton-A-methylester umfassend die Schritte von:
  - a) Herstellen von Sorbicillacton A wie in den Ansprüchen 1-19 beschrieben,
  - b) Versetzen von in Methanol gelöstem Sorbicillacton A mit konzentrierter Schwefelsäure,
  - c) Rühren bei Raumtemperatur für 6 h,
  - d) Zugabe von Wasser,
  - e) Extrahieren mit Ethylacetat,

- f) Eindampfen der organischen Phasen im Vakuum, und
- g) Reinigen des Rückstandes durch präparative HPLC.

21. Verfahren zur Herstellung eines Pharmazeutikums umfassend die Schritte von:

- a) Herstellen von Sorbicillacton A oder Derivate davon wie in den Ansprüchen 1-19 beschrieben, und
- b) Formulieren einer pharmazeutischen Zusammensetzung unter der Verwendung pharmazeutisch akzeptabler Hilfs- und Zusatzstoffe.

22. Verfahren zur Herstellung eines Pharmazeutikums nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß Sorbicillacton A oder Derivate davon in einer Menge vorliegen, daß ein Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 30 µg/ml bei der Behandlung in vivo vorliegt.

23. Verwendung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon als Auslöser von Apoptose in erkrankten Zellen, insbesondere Tumorzellen.

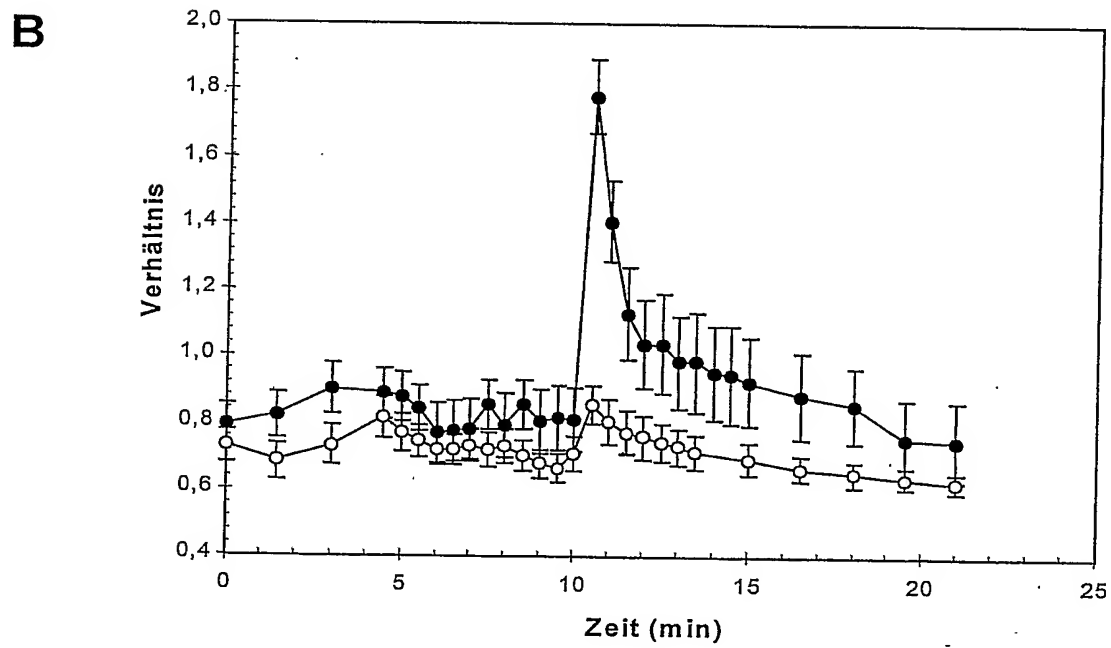
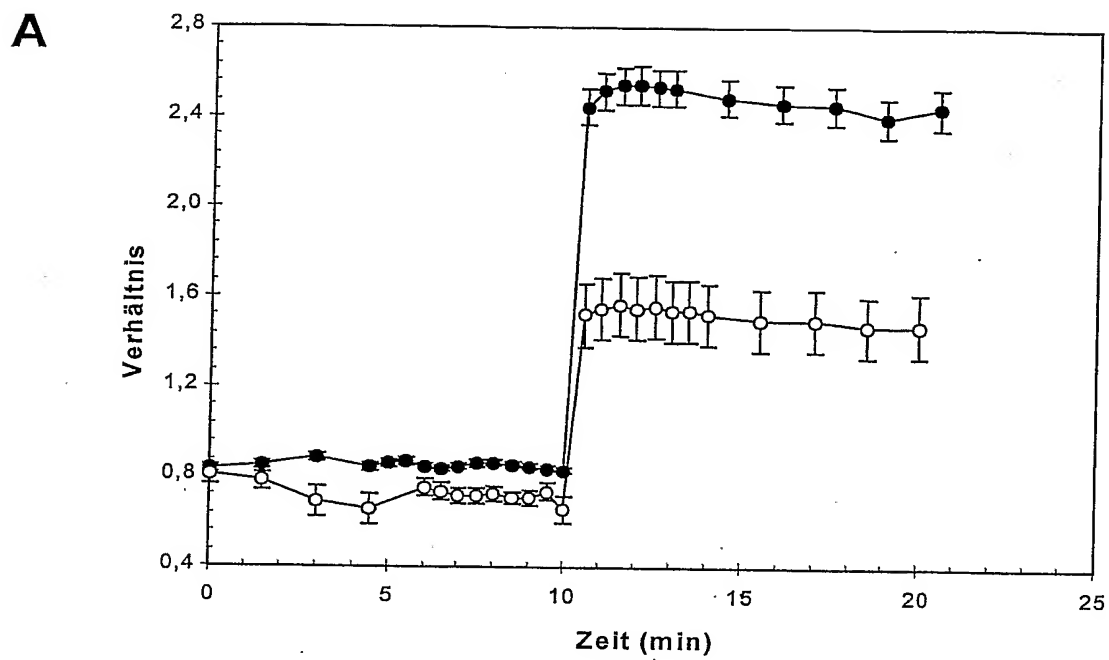
24. Verwendung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon bei der Behandlung von Leukämie.

25. Verwendung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

26. Verwendung von Sorbicillacton A oder Derivaten davon bei der Behandlung bakterieller und fungaler Infektionen.

27. Pilzstamm der Gattung *Penicillium chrysogenum* KIP 3201, mit der Hinterlegungsnummer DSM 16137.

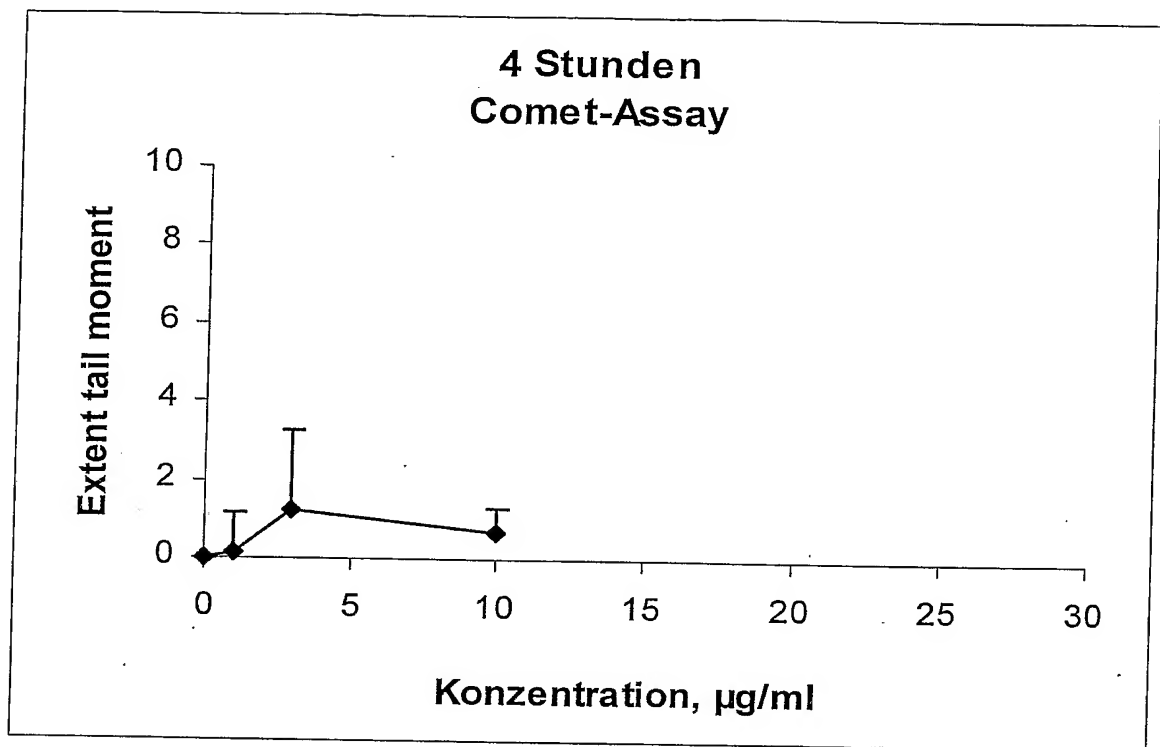
Figur 1



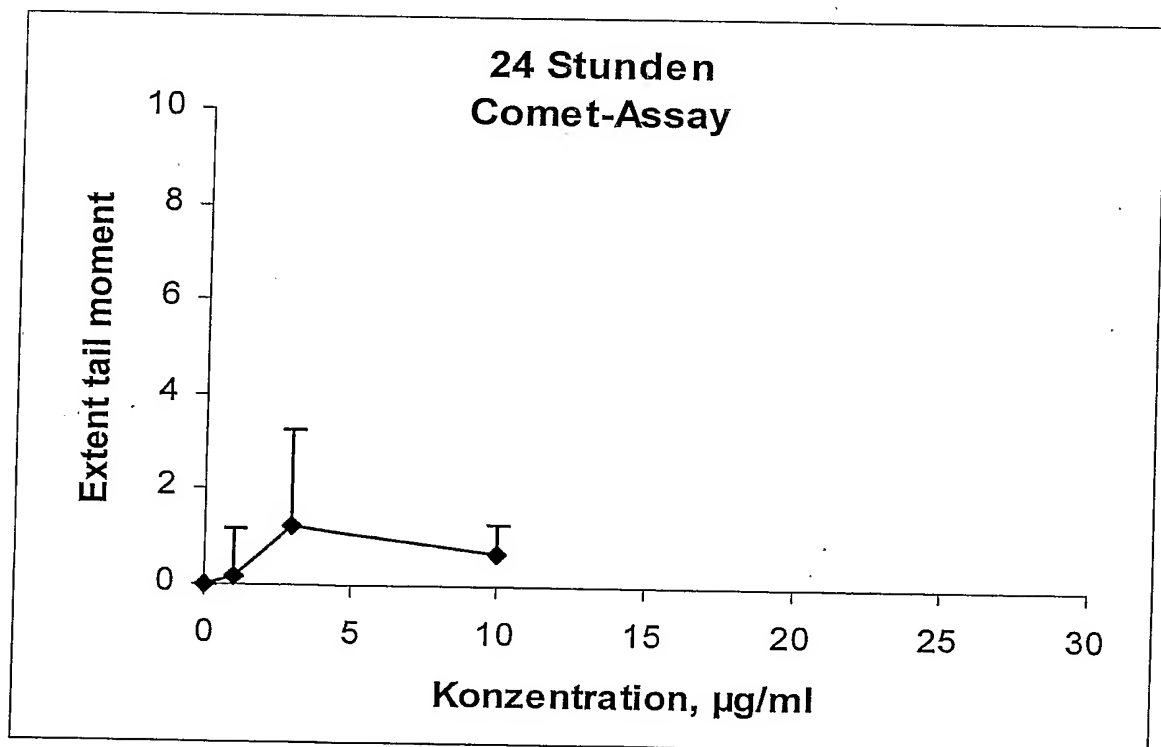


Figur 2

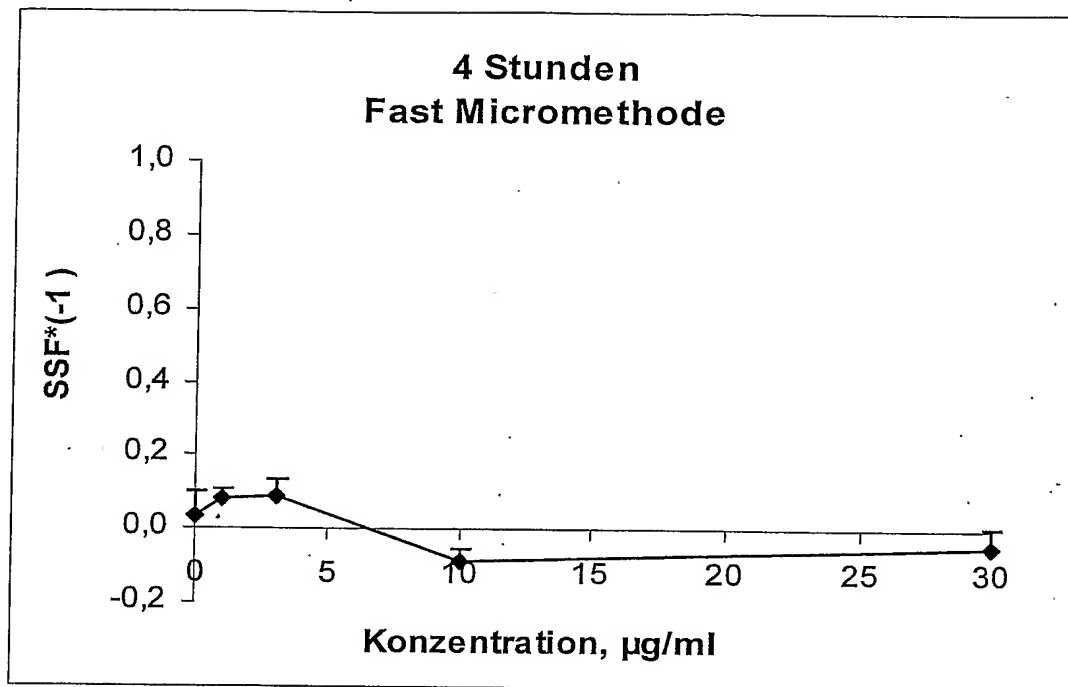
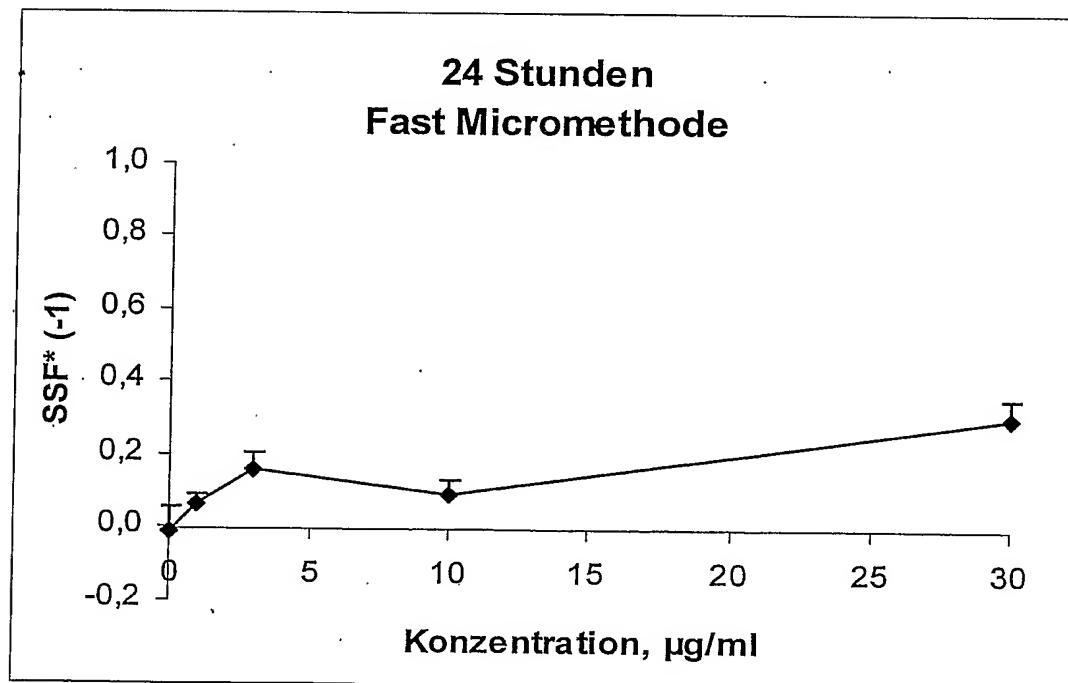
A



B



Figur 3

**A****B**

**DSMZ**Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und  
Zellkulturen GmbHBUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

07.03.2005

## INTERNATIONAL FORM

Universität Kiel  
Institut für Meereswissenschaften  
Düsternbrooker Weg 20  
24105 Kiel

REC'D 16 MAR 2005	
WIPO	PCT

VIABILITY STATEMENT  
issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name:	Universität Kiel Institut für Meereswissenschaften	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:	
Address:	Düsternbrooker Weg 20 24105 Kiel	DSM 16137	
		Date of the deposit or the transfer <sup>1</sup> :	
		2004-01-14	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on		2004-01-14	
On that date, the said microorganism was			
(x) <sup>3</sup> viable			
( ) <sup>3</sup> no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED			
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY			
Name:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH		
Address:	Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		
		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):	
		Date: 2004-01-20	

<sup>1</sup> Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).  
<sup>2</sup> In the cases referred to in Rule 10.2(a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.  
<sup>3</sup> Mark with a cross the applicable box.  
<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

07.03.2005

**DSMZ**Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und  
Zellkulturen GmbH

## INTERNATIONAL FORM

Universität Kiel  
Institut für Meereswissenschaften  
Düsternbrooker Weg 20  
24105 Kiel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

<b>I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</b>	
Identification reference given by the DEPOSITOR: KIP 3201	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 16137
<b>II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION</b>	
<p>The microorganism identified under I. above was accompanied by:</p> <p>( ) a scientific description (x) a proposed taxonomic designation</p> <p>(Mark with a cross where applicable).</p>	
<b>III. RECEIPT AND ACCEPTANCE</b>	
<p>This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2004-01-14 (Date of the original deposit)<sup>1</sup>.</p>	
<b>IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION</b>	
<p>The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).</p>	
<b>V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY</b>	
<p>Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</p> <p>Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):</p> <p><i>U. Wehs</i></p> <p>Date: 2004-01-20</p>

<sup>1</sup> Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.